

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität
Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr.med. F. Hoff)

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE STROMALIPIDE
FRISCHER UND GEALTERTER ERYTHROZYTEN

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Steffen Bender
aus Hannover

Frankfurt/M. 1963

1964



Dekan:

Prof. Dr. J. Frey

Referent:

Prof. Dr. H. Fischer

Korreferent:

Prof. Dr. A. Wacker, Prof. Dr. E. Heinz

Mündliche Prüfung:

5. Feb. 1964

INHALT

EINLEITUNG	4
----------------------	---

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Überblick über den Arbeitsgang	9
II. Darstellung der Methoden im einzelnen	11
1. Inkubation der Erythrozyten	11
2. Darstellung der Membranen frischer Erythrozyten, deren Extraktion und Lipoiddialyse	13
3. Bestimmung des Lipid-Phosphors	15
4. Untersuchung der Phospholipide durch Chromato- graphie und Radiometrie	18
5. Identifizierung der Phospholipide	19

ERGEBNISSE

1. Die Phospholipide des Erythrozyten	20
2. Untersuchungen an frischen Erythrozyten	23
a.) Der Einfluß der Inkubationsdauer auf die $^{32}\text{PO}_4$ -Aufnahme	23
b.) Phosphat-Aufnahme unter IAG-Inkubation	24
3. Untersuchungen an gelagerten Erythrozyten	27
a.) Der Einfluß des IAG-Gemisches und des Toluidinblaus auf die Phospholipide	27
b.) Die Wirkung von Uridin und Cytidin	28
c.) Die Hemmung des Lipid-Stoffwechsels durch Monojodacetat	29
4. Wiedergabe der Ergebnisse in Kurven und Tabellen	30

DISKUSSION

1. Der Wirkungsmechanismus von Toluidinblau und Monojodacetat	39
2. Besprechung der Ergebnisse	41

ZUSAMMENFASSUNG	48
---------------------------	----

LITERATUR

EINLEITUNG

Untersuchungen des Stoffwechsels der Erythrozyten begannen mit einer entscheidenden Entdeckung O. Warburgs (1). Während man bis 1909 geglaubt hatte, die roten Blutkörperchen entbehrten jeder Stoffwechselaktivität, konnte Warburg den Sauerstoffverbrauch roter Blutzellen nachweisen; er stellte sich allerdings im Vergleich zu kernhaltigen Zellen als sehr gering heraus. Später wurde von McLeod 1913 (2) gefunden, daß Erythrozyten Glucose verbrauchen und daß dieser Verbrauch in Beziehung zur Stoffwechselaktivität steht. Heute wissen wir, daß beim Abbau der Glucose im Erythrozyten die gleichen Zwischenstufen durchlaufen werden, wie sie Embden, Meyerhof, Warburg u.a. an Hefezellen und Muskelgewebe erarbeiteten (3/4/5). Neben der anaeroben Spaltung, die in Anerkennung der Pionierleistung ihrer Entdecker als Embden-Meyerhof-Weg der Glykolyse benannt wurde, findet jedoch auch ein oxydativer Abbau von Glucose statt. Dieser oxydative Abbauweg wird als Warburg-Dickens-Horecker-Shunt bezeichnet (6/7/8).

Um die Bedeutung der verschiedenen Stoffwechselwege richtig verstehen zu können, betrachtet man am besten die Reifung und Alterung des Erythrozyten.

Reticulocyten haben einen relativ großen Stoffumsatz; ihre Atmung d.h. oxydative Glucoseverwertung ist bedeutend. Reife Erythrozyten haben dagegen eine geringe Atmung,

die mit fortschreitender Alterung - und das gleiche gilt für die Lagerung in der Blutkonserve - weiter abnimmt (9). Wichtiger als die Atmung ist jedoch die Abnahme des Glucoseverbrauches bei zunehmender Differenzierung bzw. Alterung (10). Biochemisch spiegelt sich die Alterung in einem abnehmenden Gehalt der Zelle an Adenosintriphosphat (ATP), dem Energielieferant der Zelle (11). Die Abnahme der Stoffwechselleistungen des Erythrozyten bei seiner Reifung sind in Abbildung 1 dargestellt.

STOFFWECHSEL der REIFESTUFEN des ERYTHROZYTEN

			
Nucleinsäuren			
DNS	+	0	0
RNS	+	+	0
Kohlehydrate			
Glycolyse	+	+	+
Pentose-P-Zyklus	+	+	+
Citronens.-Zyklus	+	+	0
Häm-Synthese	+	+	0
Protein-Synthese	+	+	0
Lipid-Synthese	+	+	+

Abb. 1 (nach I.M. London (3) modifiziert)

Der Verlust wesentlicher Stoffwechselsysteme erklärt die begrenzte Lebensfähigkeit der roten Blutzelle und ihre erhöhte Hämolysebereitschaft mit der Alterung. Dies ist auch der Grund für die auf 21 Tage begrenzte Verwendbarkeit von Blutkonserven für Transfusionszwecke (12).

Das Bemühen der Blutkonservierungsforschung geht dahin, Stabilisatoren zu finden, die eine Verlängerung der Konservierungszeit ermöglichen (5/13/14/15).

Eine grundlegende Beobachtung hierzu wurde von Z. Dische (16/17) gemacht, der feststellte, daß Erythrozyten-Hämolysate imstande sind, Purin-Nucleoside phosphorolytisch zu spalten. Dabei entsteht neben dem jeweiligen Purin stets Ribosephosphat, welches direkt in den sogenannten Pentose-Phosphat-Zyklus einmünden kann. Von dieser Beobachtung ausgehend konnten Prankerd und Altman (18/19) auch an intakten Erythrozyten eine Aktivierung des Stoffwechsels durch Adenosin nachweisen. Gabrio und Finch (20/21) bestätigten dieses Ergebnis und hoben die gleichartige Wirkung des nicht-toxischen Nucleosids Inosin hervor. Durch die Kombination von Inosin mit der Purinbase Adenin durch Nakao und Yoshikawa konnte eine die Wirkung von Inosin übersteigende Hebung des ATP-Spiegels gealterter Erythrozyten und eine deutliche Verbesserung der osmotischen Resistenz erzielt werden (22/23).

In Deutschland haben von ganz anderer Problemstellung ausgehend Fischer und Fritzsche das Gebiet der Erythrozyten-Konservierung aufgenommen. Gemeinsam mit Wosegien und Ferber wurden systematisch viele Kombinationen von Purinen und Nucleosiden auf ihre Fähigkeit, die Alterungsvorgänge in Blutkonserven günstig zu beeinflussen, untersucht. (5/11/24/25). Dabei stellte sich ein Gemisch aus Inosin (20 mM), Adenin (0,5 mM) und Guanosin (0,5 mM) --- als I A G bezeichnet --- als optimal heraus. Die mit I A G konservierten Erythrozyten weisen über 40-50 Tage einen wesentlich höheren ATP-Spiegel auf als Kontrollen

Diese Erythrozyten sind, worauf besonders hingewiesen werden soll, mechanisch resistenter. Auf Spender übertragen überleben I A G-Erythrozyten länger als gleichaltrige ACD-konservierte rote Blutzellen.

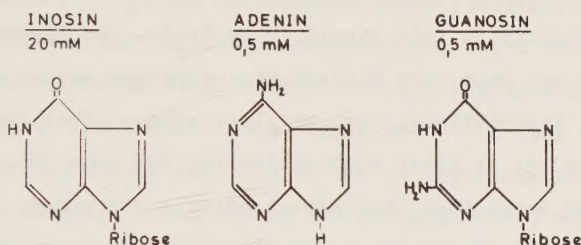


Abb. 2 Zusammensetzung des I A G - Gemisches

Von der biochemischen Forschung sind in den letzten Jahren enge Beziehungen zwischen Stoffwechsel und Struktur der Zelle erarbeitet worden (27). So ist die Zellstruktur stoffwechselmäßig nicht als ruhend zu betrachten. Sie unterliegt vielmehr einem ständigen Umbau in Abhängigkeit von der Höhe des Energiestoffwechsels.

Bei einem Anstieg der Stoffwechselaktivität des Erythrozyten durch die Wirkung des Purin-Nucleotid-Gemisches I A G drängt sich die Frage einer möglichen Strukturänderung der gealterten Erythrozytenmembran auf. Diese Änderung würde eine Erklärung für die Zunahme der mechanischen und osmotischen Resistenz geben.

Die Erythrozyten-Membran besteht aus Eiweiß (Stromatin) und Lipiden. Letztere setzen sich aus Cholesterin und

Phospholipiden zusammen (28). Von den Phospholipiden werden Sphingomyelin, Kephalin und Lecithin als Hauptbestandteile angegeben (29/30/31/32).

Aus Untersuchungen mit radioaktiv ^{14}C -markiertem Glycin und Acetat (33/34) geht hervor, daß nach der Ausreifung des Erythrozyten kein Eiweiß (Hämoglobin- und Stroma-Eiweiß) und kaum noch Cholesterin aufgebaut werden, während Phospholipide noch gebildet werden. Nach diesen Befunden ist es nicht ausgeschlossen, daß eine Erneuerung bestimmter Membranbestandteile von einer Erhöhung des Stoffwechsels der Phospholipide ausgeht.

Die Synthese der Lipide geht mit einem hohen Verbrauch an ATP, dem Energielieferant der Zelle, einher (35/36). Durch das Purin-Nucleosid-Gemisch I A G, ferner den Redox-Farbstoff Toluidinblau und den Ferment-Hemmer Monojodacetat (MJA) läßt sich über den Kohlehydratstoffwechsel Einfluß auf den ATP-Spiegel im Erythrozyten nehmen (11). So ist unter der Wirkung der genannten Stoffe eine Änderung im Baustoffwechsel der roten Blutzelle zu erwarten.

Meine Hauptaufgabe sollte es daher sein, experimentell zu prüfen, ob eine Erhöhung der Phospholipid-Synthese im Erythrozyten unter I A G - Wirkung stattfindet.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Überblick über den Arbeitsgang

In den Versuchen wurden Erythrozyten von frischem und gelagertem Blut mit gleichen Mengen radioaktiven Phosphors ($^{32}\text{PO}_4$) und unterschiedlichen Kombinationen von Glucose, dem Purin-Nucleosid-Gemisch I A G und in einigen Versuchen auch Toluidinblau und Monojodacetat inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über zwei Stunden. In dieser Zeit liefen die untersuchten Stoffwechselvorgänge unter Einbau des anorganischen, radioaktiven Phosphats in die organischen Zellverbindungen ab. Mehrmaliges Waschen der Erythrozyten mit physiolog. NaCl-Lösung befreite das Inkubationsmedium von Radioaktivität. Zur Gewinnung der Erythrozyten-Membranen (Schatten oder "ghosts") wurde die Hämolyse mit Aqua dest. durchgeführt. Nach abermaligem Waschen bezog sich die Aktivität auf die Schatten. Diese wurden gefriergetrocknet und aus ihnen mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel die Lipide extrahiert. Die Phospholipide wurden durch Dialyse von nicht phosphorhaltigen Lipiden (Cholesterin und Fettsäuren) befreit und waren so in gereinigtem Zustand für die Chromatographie verwendbar. Im Dialysat wurde der Lipidphosphor bestimmt und die Phosphorlipide auf gleiche Konzentration in den unterschiedlichen Proben eines Versuches gebracht. In aufsteigender Chromatographie erfolgte die Trennung des Phospholipid-Gemisches in seine Einzelkomponenten.

Die fertigen Chromatogramme, in Streifen den Einzel-läufen entsprechend zerschnitten, durchliefen hierauf einen Radiopapierchromatographen. Die Radioaktivität der einzelnen Banden wurden von einem Linienschreiber in Kurvenform aufgezeichnet. Die Planimetriewerte dieser Kurven stellen ein relatives Maß der spezifischen Aktivität der Phospholipide dar.

Der dargestellte Versuchsgang gibt die Arbeitsweise mit frischen Erythrozyten wieder. Alte Erythrozyten zeigen geringere Umsatzraten des Phospholipid-Stoffwechsels. Das Arbeiten mit gelagerten, 40 Tage alten Zellen wurde möglich durch ein erst später entwickeltes, fabrikmäßig mit Kieselsäure imprägniertes Chromatographie-Papier (Firma Schleicher & Schüll). Dieses erlaubt, mit dreimal höheren Lipidmengen als mit dem bei frischen Erythrozyten benutzten, selbstimprägnierten Papier zu arbeiten. Zudem bedarf es bei der Chromatographie mit diesem Papier keiner gereinigten Lipidextrakte. So konnte bei den Versuchen mit alten Erythrozyten die Gefriertrocknung und die Dialyse eingespart werden. Es wurden die gewaschenen ganzen Erythrozyten sofort mit dem Extraktionsmittel behandelt.

II. Darstellung der Methoden im einzelnen

1. Inkubation der Erythrozyten

Das verwendete Blut:

Konservenblut: In den Blutkonserven wurde das Blut im Verhältnis 5:1 mit dem allgemein üblichen ACD-Stabilisator bei 4° C gelagert. In den Versuchen mit gelagerten Erythrozyten kamen ca. 40 Tage alte Konserven zur Anwendung.

Frischblut: Das Frischblut wurde einem gesunden Spender entnommen und entsprechend dem Konservenblut im Verhältnis 5:1 mit dem ACD-Stabilisator gemischt.

Das Erythrozyten-Sediment:

Frisch- und Konservenblut wurde 20 min bei 3000 U/min in großen Zentrifugengläsern zentrifugiert. Neben dem überstehenden Plasma wurde die oberste Schicht des Erythrozyten-Sediments abgesaugt, da sich in ihr bei Verwendung frischen Blutes die Leukozyten, bei gealtertem Blut Zelldetritus hämolysierter Erythrozyten ansammeln. Dem verbleibenden Sediment wurden für die Inkubationsansätze 2 ml Blut bei frischen und 6 ml bei alten Erythrozyten entnommen.

Die Inkubationsbedingungen:

Die Inkubation der Erythrozyten erfolgte in Weithals-Erlenmeyer-Kölbchen bei 37° C im Wasserbad. Das Erythrozyten-Sediment wurde im gleichen Volumen Inkubationsmedium suspendiert; diesem waren die Substrate, auf Endkonzentration berechnet, zugesetzt. Die Erythrozyten-

suspension bedeckte den Boden des Kölbchens in einer etwa 0,5 cm hohen Schicht. Um den roten Blutzellen genügend Sauerstoff zur Atmung zur Verfügung zu stellen, wurden die Kölbchen mit Carbogen (80 % Sauerstoff/ 20 % Kohlendioxyd) durchströmt und alle halbe Stunde kürzere Zeit geschüttelt. Die Inkubation wurde vom Augenblick des Zusatzes radioaktiven Phosphors gerechnet und erfolgte in der Regel über 2 Stunden.

Das Inkubationsmedium:

Den Erythrozyten diente als Inkubationsmedium eine Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung (37), deren Zusammensetzung im folgenden wiedergegeben sei:

100 Teile	0,9 % NaCl
4 Teile	1,15 % KCl
1 Teil	2,11 % KH_2PO_4
1 Teil	3,82 % $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$
12 Teile	0,1 M Phosphatpuffer
Phosphatpuffer: 17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	
20,0 ml 1-n HCl / H_2O ad 1000 ml	

Die Substrate zur Inkubation wurden in folgenden Konzentrationen angewandt:

Purin-Nucleosid-Gemisch I A G

Inosin 20 mM / Adenin 0,5 mM / Guanosin 0,5 mM

Toluidinblau 10^{-2} mM

Monojodacetat (MJA) 1,0 mM

Glucose 300 mg%

Der radioaktive Phosphor:

Das Isotop P^{32} zerfällt als β -Strahler mit einer Halbwertszeit von 14,3 Tagen. Es wurde in den Versuchen als $^{32}\text{PO}_4^-$ Ion im Form radioaktiver Phosphorsäure verwandt.

Den Versuchsansätzen wurde bei frischen Erythrozyten $80\mu\text{C}$, bei alten Erythrozyten $300\mu\text{C}$ zugesetzt.

Waschen der Erythrozyten nach der Inkubation:

Aus den Erlenmeyer-Kölbchen wurden die inkubierten Erythrozyten quantitativ in Zentrifugengläser überführt und viermal mit physiolog. NaCl-Lösung gewaschen. Es wurde jeweils 20 min bei 3000 U/min zentrifugiert und in der Kälte nahe dem Gefrierpunkt gearbeitet.

2. Darstellung der Membranen frischer Erythrozyten, deren Extraktion und die Lipoiddialyse.

Zusatz von 10 ml destillierten Wassers zu dem gewaschenen Erythrozyten-Sediment hämolysierte die roten Blutkörperchen. Um die Schatten von wasserlöslichen, radioaktiven Phosphatverbindungen zu befreien, war es nötig, die hämolysierten Erythrozyten sechsmal zu waschen. Nach dem Zentrifugieren wurde jeweils der Überstand von radioaktivem, hämoglobinhaltigem Waschwasser vorsichtig abgesaugt und der Bodensatz von Membranen mit 10 ml Aqua dest. neu aufgeschüttelt und erneut zentrifugiert. Bei dem feinflockigen Sediment mußte lange zentrifugiert werden. Durch Zusammenballen der Membranen wurden die Zeiten bei jedem folgenden Zentrifugieren kürzer: 1., 2., 3., 4., 5., 6. Zentrifugieren: 120, 60, 60, 30, 30, 20 min. Die Schatten wurde als rötliche Masse bei klarem Zentrifugationsüberstand erhalten. Sie wurden nun eingefroren und in einem Exsiccator mit Hochvakuum-Anschluß gefriergetrocknet.

Aus einem Milliliter Erythrozyten-Sediment ließen sich 18 - 20 mg hellbraune Schatten gewinnen.

Die feinpulverisierten Schatten wurden mit 10 ml Chloroform/Methanol 4:1 über 12 Stunden extrahiert. Der Extrakt wurde abfiltriert, das Extraktionsmittel verdampft und der Lipid-Rückstand in Petroläther aufgenommen.

Quantitativ in Gummifingerlinge überführt, erfolgte die Dialyse der Extrakte (40) gegen Petroläther über 12 Stdn. Nicht phosphorhaltige Lipide diffundieren in dieser Zeit in das Außendialysat. Durch Bilanzversuche ist der konstante Phosphorgehalt im Innendialysat vor und nach Dialyse gesichert. Zur Dialyse wurden Fingerlinge von Continental-Gummihandschuhen benutzt, die im Rückflußkühler 24^h in Äther und darauf weitere 24^h in Petroläther gekocht, von störenden Fettstoffen frei waren.

Der unter Abschnitt 2 beschriebene Arbeitsgang gilt für frische Erythrozyten. Aus den dargelegten Gründen (siehe Seite 10) konnten diese Verarbeitungsstufen bei allen Erythrozyten entbehrt werden. - Das Sediment der gealterten roten Blutkörperchen wurde vielmehr sofort nach dem Waschen mit 60 ml Bloorschem Extraktionsmittel (Äther/Äthanol 1:3) über 12 Stunden extrahiert. Das organische Lösungsmittel muß langsam unter Rühren dem Sediment zugegeben werden. Dieses Vorgehen ist zum Gewinnen einer fein-granulierten Suspension zu beachten.

3. Die Bestimmung des Lipid-Phosphors

Es ist verständlich, daß bei einem langen Arbeitsgang mit vielen Versuchsteilschritten Substanz verloren geht und daß somit die Phospholipidmengen in den einzelnen Ansätzen unterschiedlich sein können. Darher war es nötig, nach Beendigung von Extraktion und Dialyse den Lipidphosphor zu bestimmen. Nur so ist es möglich, von gleichen Lipidmengen bei der Chromatographie auszugehen und die Ansätze miteinander zu vergleichen.

Das Lösungsmittel der Lipidextrakte wurde daher verdampft und die verbleibenden Lipide mit Chloroform in Meßkölbchen definierten Volumens überführt. Diesen wurde zur Phosphorbestimmung 0,2 ml entnommen. Aus der Phosphormenge dieser Stichprobe wurde der Gesamt-Lipidphosphor errechnet. Es wurden zwei Stichproben entnommen. Aus den Meßkölbchen wurden bei genauestem quantitativen Arbeiten die Lipide nach Verdampfen des Chloroforms in Mikroreagenzgläser (Volumen um 2,5 ml) überführt. In diesen wurden die Lipide am Boden zum Trockenen eingeengt.

Die Technik der Phosphor-Bestimmungsmethode:

Die Phosphor-Bestimmung wurde nach der Methode von Berenblum und Chain (41) durchgeführt. Die Methode beruht auf der Umsetzung von anorganischen Phosphationen mit Molybdänsäure zur Phosphormolybdänsäure, die in Alkohol gelöst durch Zinnchlorid zum blauen Phosphormolybdänsäure-Komplex reduziert wird. Dieser wird photometrisch erfaßt und stellt ein Maß für den bei der Hydrolyse freigesetzten

Phosphor dar. Die Originalmethode erfuhr in den Versuchen eine Abwandlung technischer Art und sei im folgenden kurz beschrieben:

Das Chloroform der Stichprobe wurde in Schliffröhrchen verdampft. Aus den verbleibenden Phospholipiden wurden die anorganischen Phosphationen durch zehn minutenlanges Kochen mit 0,5 ml Perchlorsäure frei. Nach Abkühlen wurden 0,875 ml Ammoniummolybdat zugesetzt und mit Aqau bidest. auf 3,5 ml aufgefüllt. Darauf wurde die Phosphor-molybdänsäure durch Schütteln (1,5 min) mit 3,5 ml Iso-butylalkohol in die alkoholische Phase überführt. Dabei



Abb. 3

nimmt aber der Isobutylalkohol Wasser auf, das durch zweimaliges Durchschütteln (1/2 min) mit jeweils 1,75 ml H_2SO_4 wieder entfernt wird. Die Reduktion zur blauen Phosphormolybdänsäure wurde Zusatz von 5,25 ml verdünnter $SnCl_2$ -Lösung (Schütteln 1/2 min) bewirkt. Nach jedem Schütteln wurde die wässrige Phase abgesaugt. Die blaue Phosphor-molybdänsäure-Lösung wurde mit

Äthanol bis zur Marke aufgefüllt. Die Photometrie erfolgte bei einer Wellenlänge von $5/8 m$ und 2 cm Schichtdicke im Photometer Eppendorf.

Lösungen für die Phosphor-Bestimmung

1. 70 %-ige HClO_4
2. 1-n H_2SO_4
3. 5 %-ige wässrige NH_4 -Molybdat-Lösung
4. 40 %-ige SnCl_2 -Stammlösung (in konz. HCl)
Die Lösung muß in brauner Flasche aufbewahrt werden.
5. 0,2 %-ige SnCl_2 -Lösung
Die SnCl_2 -Stammlösung wird 1:200 mit 1-n H_2SO_4 (Lösg. 2) verdünnt. Diese Lösung ist vor Gebrauch neu anzusetzen
6. Isobutylalkohol
7. Äthanol

Es ist streng auf Sauberkeit der Lösungen zu achten, da Spuren von Phosphat die Werte der Mikro-Bestimmung verfälschen. Daher wurden auch die zur Bestimmung benutzten Glasgeräte mit Chromschwefelsäure und mehrmaligem Spülen mit Aqua dest. gereinigt.

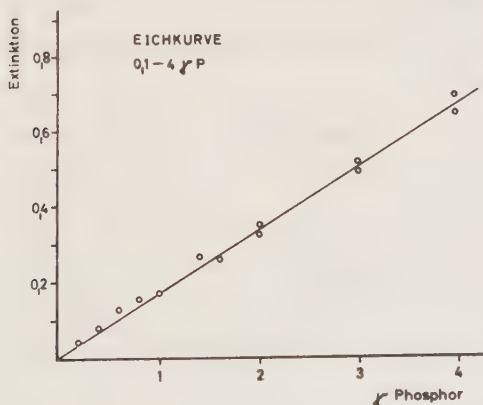


Abb. 4 Eichkurve für 0,1 - 4 P

4. Untersuchung der Phospholipide durch Chromatographie und Radiometrie

Papierchromatographie:

Nach der Phosphorbestimmung war die Gesamt-Phospholipid-Menge (in P) jedes Ansatzes bekannt. Die Lipide wurden nun in Chloroform zu gleichem Phospholipid-Gehalt pro Volumeneinheit gelöst. Das Lösen der Lipide erfolgte unmittelbar vor dem Auftrag auf die Chromatographie-Bögen, um durch Verdampfen des flüchtigen Chloroforms eine Konzentrationsänderung zu vermeiden. Außerdem wurden die Röhrchen in Kohlensäureschnee gekühlt. Bei frischen Erythrozyten betrug die Konzentration an Lipidphosphor 0,5 mg/ml, bei alten Erythrozyten 1,25 mg/ml. Die Phospholipide wurden mit einer Sahli-Pipette (Volumen 0,02 ml) aufgetragen. Auf eine Startlinie von 3 cm erfolgte der Auftrag von 4 Sahlipipetten pro Ansatz. Dies entspricht bei frischen Erythrozyten einer Menge von 40, bei alten Erythrozyten von 100 Lipidphosphor. - Für die Chromatographie dienten Papierbögen der Firma Schleicher & Schüll (Papiersorte 2043 a mgl), die nach den Angaben von Marinetti (42) mit Kieselsäure imprägniert wurden. (Versuche mit frischen Erythrozyten). Auf fabrikmäßig imprägnierten Papieren des gleichen Herstellers wurden die Phospholipide alter Erythrozyten getrennt. Die Bögen wurden auf ein Format 19 X 33 cm zugeschnitten; der Auftrag erfolgte 4 cm vom unteren Rand entfernt. Die Chromatographie wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Auf selbstimprägniertem Papier betrug die Laufzeit 16 - 17^h,

bei fabrikmäßig imprägnierten Bögen 10 - 11 Stunden.

Chromatographie-Lösung

Diisobutylketon/Eisessig/H₂O 8 : 5 : 1

Die Radiometrie:

Die fertigen Chromatogramme wurden in Streifen der Breite 3,8 cm entsprechend den einzelnen Läufen zerschnitten. Die Auswertung erfolgte mit dem Radiopapierchromatographen FH 453 kombiniert mit dem Meßgerät FH 49 und dem Linienschreiber FH 585 (Firma Friessecke & Hoepfner). Letzterer zeichnet die Aktivität der einzelnen Chromatogramm-Banden als Kurven auf. Die Flächen unter den Kurven wurden planimetriert und stellen ein Maß der Aktivität der einzelnen Phospholipid-Fractionen dar.

Die Untersuchungen der Aktivität in ganzen Erythrozyten und deren Membranen wurden mit dem Szintillationszähler FH 488 durchgeführt.

5. Identifizierung der Phospholipide

Autoradiographie:

Bei einigen Chromatogrammen wurden die radioaktiven, phosphathaltigen Banden durch Autoradiographie nach Befestigen der Streifen für etwa eine Woche auf Röntgen-Film-Tagespackungen (Doneo-Film) zur Darstellung gebracht.

Farbnachweise (43):

Phosphormolybdänsäure-Färbung: Die Chromatogramme wurden 5 min in eine 0,5 %-ige wässrige Phosphormolybdänsäure-Lösung gelegt, hierauf 10 min in fließendem Wasser gespült

und dann kurz durch eine 4 %-ige SnCl_2 -Lösung gezogen. Die SnCl_2 -Lösung wurde jeweils vor der Färbung frisch aus einer 40 %-igen SnCl_2 -Stammlösung (in konz. HCl) durch Verdünnen mit Aqua dest. 1:10 zubereitet. Die Phospholipide färben sich als blaue Banden an. Rhodamin-Färbung: Nach 20 Minuten langer Färbung der Chromatogramme mit 0,01 %-iger wässriger Rhodamin-B-Lösung und kurzem Waschen in Aqua dest. leuchten die Phospholipide auf rosa Untergrund im UV-Licht hell auf.

ERGEBNISSE

1. Die Phospholipide des Erythrozyten

Die Gesamt-Phospholipide

Durch Extraktion konnten aus den Erythrozyten /5 Lipid-phosphor/ml Sediment bestimmt werden. Wenn man, wie Anderson und Turner (44) ein Molekulargewicht von 775 für Lecithin annimmt, so ergibt sich eine Menge von ca. 1,8 mg Phospholipide/ml Erythrozyten-Sediment, entsprechend 0,103 mg Phospholipide auf 1 mg lyophilisierte Membranen (Trockengewicht). (25 X Lipid-Phosphor). Die Zahlen stimmen mit den Angaben von Anderson und Turner (44) überein, die ebenfalls in menschlichen Erythrozyten einen Phospholipidgehalt von 10 mg/100 mg Schatten bestimmten. Der Gesamt-lipid-Gehalt (einschließlich Cholesterin, Ester und Fettsäuren) liegt etwa doppelt so hoch.

Die getrennten Phospholipide

Auf kieselensäure-imprägniertem Papier konnten die Phospholipide getrennt werden. Färberisch stellten sich vier Banden dar. Deutlich treten mit ansteigenden R_f -Werten Sphingomyelin, Lecithin und Kephalin hervor. Diese Phospholipide sind schon aus den Untersuchungen von Turner (30), de Gier (31), Parpart und Ballentine (29) und Klibansky (32) als Bausteine der Erythrozyten-Membran bekannt. Über die Natur der vierten Bande liegen für Erythrozyten keine sicheren Angaben vor. Es handelt sich bei dieser Bande höchst wahrscheinlich um Phosphatidsäuren bzw. deren chemisch als Polymerisationsprodukte verwandte Polyglycerophosphate. Über diese Verbindungen berichtet Marinetti (45) bei papierchromatographischen Trennungen der Phospholipide von Rattengewebe. Die Trennungen wurden mit der hier angegebenen Technik nachgearbeitet. Die bisher unbekannte Bande konnte im Bereich der Phosphatidsäuren bzw. Polyglycerophosphate von Marinetti lokalisiert werden. Auch ein Versuchspräparat reiner Phosphatidsäure^{x)} läuft bei der Chromatographie an die Stelle der obersten Bande. Diese trennte sich manchmal in Unterfraktionen auf. - Erst bei den Versuchen mit radioaktivem Phosphor wurde in unmittelbarer Nähe des Startes eine weitere nur durch Radiometrie und Autoradiographie feststellbare Bande aufgedeckt. Angaben über diese Verbindung fehlen in der Literatur. Die Natur

x) Ich danke Herrn Prof. Vogt (Med. Forschungsanstalt der Max Planck Gesellschaft/Göttingen) für sein Entgegenkommen.

dieser Bande bleibt ungeklärt. Die Verbindung wird im folgenden als **Fraktion A** bezeichnet.

In Abbildung 5 sind die Ergebnisse der chromatographischen Trennung, der Radiometrie und Autoradiographie gegen-
übergestellt. Sie sind einem Versuch (VI 3b) mit alten Erythrozyten nach Inkubation mit Glucose und dem Purin-Nucleosid-Gemisch I A G entnommen.

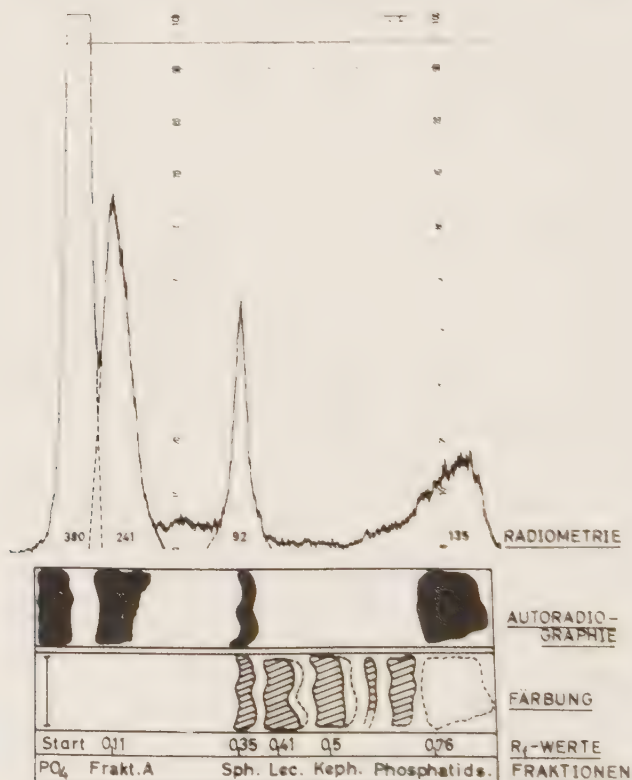


Abb. 5

2. Untersuchungen an frischen Erythrozyten

Der Einfluß der Inkubationsdauer auf die $^{32}\text{PO}_4$ -Aufnahme:

Um die Aufnahme radioaktiver Phosphationen in ganze Erythrozyten, deren Stromata und Phospholipide in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer zu verfolgen, wurden frische Erythrozyten 1, 5, 10 und 15 Stunden inkubiert. Die Aktivitäten im Erythrozyten-Sediment und in den nach Hämolyse und mehrmaligem Waschen erhaltenen "ghosts" sind in der Abbildung 6 wiedergegeben.

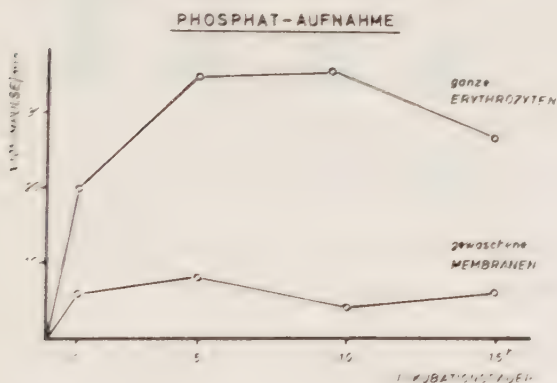


Abb. 6

Anschließend wurden die "ghosts" extrahiert und die gereinigten Phospholipide chromatographiert. Die Planimetrie-Werte, als Maß der Aktivität der Einzelbanden, sind für Lecithin, Kephalin und die Phosphatidsäuren bzw. Polyglycerophosphate aufgezeichnet. (Abb. 7). Letztere waren in drei Fraktionen getrennt. Die Sphingomyelin-Aktivität war nicht genügend scharf durch die Radio-metrie erfasst und konnte nicht planimetriert werden.

PHOSPHOLIPID-SYNTHESE

Planimetrie-Werte der radiometrierten Chromatogramme

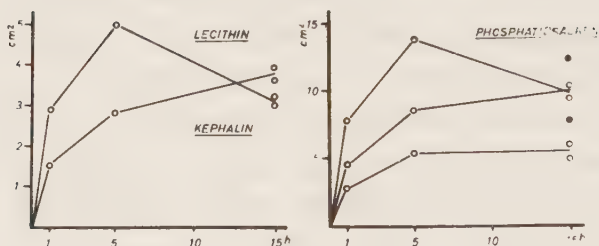


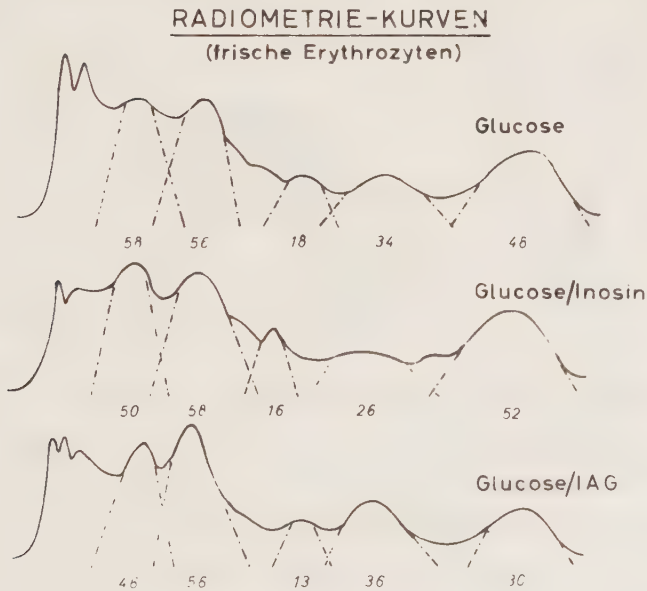
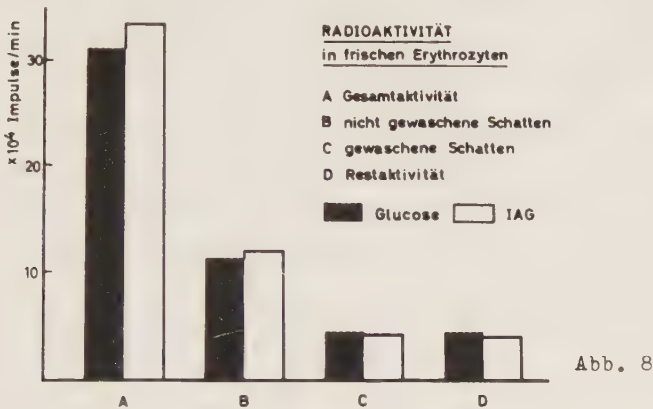
Abb. 7

Die Kurven der Abb. 6 zeigen einen zeitlichen **Anstieg** des Phosphat-Einbaus in die Verbindungen des ganzen Erythrozyten und dessen Stroma. Dieses Verhalten spiegelt sich auch in den Kurven des Phosphateinbaus in die Phospholipide wieder. Bei fast allen Kurven lassen die Aktivitäten ein Maximum bei etwa 5 Stunden erkennen; sie fallen bis 15 Stunden wieder leicht ab. Für Kephalin trifft letzteres Verhalten nicht zu.

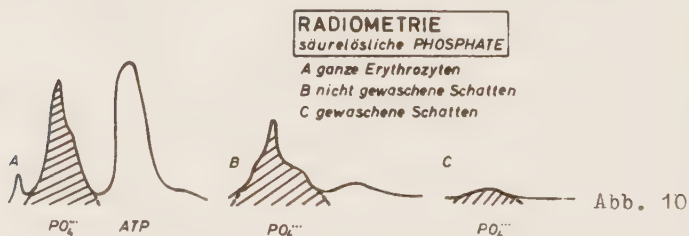
Phosphat-Aufnahme unter I A G - Inkubation bei frischen Erythrozyten

Im folgenden wurde die Phosphat-Aufnahme in frische Erythrozyten, deren Membranen und Phospholipide nach 5-Stunden-Inkubation mit Glucose und I A G verglichen. In Abbildung 8 ist der Abfall der Aktivität nach den verschiedenen Versuchsschritten vergleichend gegenübergestellt. - Es ist die etwa gleich starke Phosphataufnahme in den ganzen Erythrozyten (Gesamtaktivität), die

Membranen und Phospholipide (letztere in Abbildung 9)
unter I A G - Inkubation und Glucose als Kontrolle zu
erkennen.



In den Schatten verbleibt nach der Lipid-Extraktion eine relativ hohe Restaktivität (Säule D in Abbildung 8). Bei der Wasserhämolyse platzen die Erythrozyten auf Grund osmotischer Druckdifferenz; die Membranen bleiben als ballonartige Hüllen erhalten (44). Es besteht die Frage, ob die Restaktivität durch radioaktive Phosphationen bedingt ist, die trotz mehrmaligem Waschen in den Erythrozyten-Hüllen verblieben sind. Die Membranen wurden daher mit Perchlorsäure extrahiert, die säurelöslichen Phosphatverbindungen durch Hochspannungselektrophorese getrennt und die Elektrophorese-Streifen radiometrisch untersucht (Technik nach Wosegien (26)). Die Abbildung 10 zeigt die Radiometrie-Kurven der Extrakt-Trennungen ganzer Erythrozyten und der hämolysierten Zellen vor und nach dem Waschen.



Die Abbildung läßt für ganze Erythrozyten (A) deutlich die Banden für ATP und anorganisches Phosphat erkennen. Aus den Kurven geht hervor, daß die nach Extraktion in den Schatten verbleibende Restaktivität nicht durch anorganische, radioaktive PO_4 -Ionen bedingt ist. Die Feststellung der Restaktivität wurde nur am Rande gemacht und dem Problem nicht weiter nachgegangen.

3. Untersuchungen an gelagerten Erythrozyten

Bei frischen Erythrozyten konnte unter I A G - Inkubation keine Erhöhung des Phospholipid-Stoffwechsels festgestellt werden. Dieses Verhalten gilt nicht für gealterte Erythrozyten. Gerade bei alten roten Blutkörperchen ist durch die starke Hebung des ATP-Spiegels und der Vermehrung des für die Synthese der Lipide notwendigen $\text{DPNH}+\text{H}^+$ und $\text{TPNH}+\text{H}^+$ eine Erhöhung des Stoffwechsels der Phospholipide zu erwarten.

Der Einfluß des Purin-Nucleosid-Gemisches I A G und des Toluidinblaus auf die Phospholipide:

Es wurde die Wirkung der Inkubationsmedien

A	Glucose	Abb. 11	[Abb. 23
B	Glucose/I A G	Abb. 12	
C	Glucose/Toluidinblau	Abb. 13	[Abb. 24
D	Glucose/Toluidinblau/I A G	Abb. 14	

bei 40 Tage alten Erythrozyten untersucht. Die Ergebnisse stützen sich auf Doppelansätze; pro Ansatz wurden zwei Chromatogramme radiometrisch untersucht.

Die Auswertung dieses Versuches ist aus den Abb. 11 - 14 ersichtlich. Die Planimetrie-Werte als Maß der Aktivität der Einzelbande sind schematisch in den Abb. 23 und 24 wiedergegeben. Die schraffiert gezeichneten Säulen bezeichnen die Werte der als Kurven wiedergegebenen Radiometrien. - Es ist ein geringer Einfluß von Toluidinblau auf die in ihrer Natur unbekannte Fraktion A und das Sphingomyelin zu erkennen.

Zusatz von I A G zum Inkubationsmedium steigert dagegen deutlich den Einbau von radioaktivem Phosphat in die Fraktion A und das Sphingomyelin. Gleichzeitig tritt eine Verminderung der Radioaktivität der Phosphatidsäuren bzw. Polyglycerophosphate ein. Das Ergebnis der Kombination von Glucose/Toluidinblau/I A G als Inkubationsmedium gleicht fast völlig dem für das I A G-Gemisch dargestellten Verhalten der Phospholipid-Aktivität. Der Phosphat-Einbau in Lecithin und Kephalin ist sehr gering. Ein Einfluß auf diese Fraktionen ist durch keine der aufgeführten Inkubationsmedien erkennbar.

Die Wirkung von Uridin und Cytidin:

Es wurde die Wirkung der Inkubationsmedien

A Glucose	Abb. 15	[Abb. 25
B Glucose/Toluidinblau	Abb. 16	
C Glucose/Toluidinblau/Uridin	Abb. 17	[Abb. 26
D Glucose/Toluidinblau/Cytidin	Abb. 18	

bei 41 Tage alten Erythrozyten untersucht. (Doppelansätze/ je Ansatz 2 Chromatogramme). Die Abbildungen 15 - 18 und 25/26 zeigen die Ergebnisse. Die Endkonzentration von Uridin und Cytidin betrug 5 mM. - Bei Inkubation alter Erythrozyten mit Uridin und Cytidin unter gleichzeitigem Zusatz von Toluidinblau zeigte sich keine Steigerung des Stoffwechsels der Phospholipide. Die Aktivitäten gleichen weitgehend der Kontrolle. - Dagegen ist auch in diesem Versuch der Einfluß des Toluidinblaus zu erkennen.

Die Hemmung des Lipid-Stoffwechsels durch Monojodacetat

Es wurde die Wirkung des Fermenthemmers Monojodacetat (MJA) auf den Phosphateinbau in die Phospholipide an 37 Tage alten Erythrozyten bei folgender Gegenüberstellung geprüft:

A	Glucose	Abb. 19	[Abb. 27
B	Glucose/MJA	Abb. 20	
C	Glucose/I A G	Abb. 21	[Abb. 28
D	Glucose/I A G/MJA	Abb. 22	

Die Abbildungen 19 - 22 und 27/28 lassen deutliche Unterschiede in der Synthese-Rate der Fraktion A, des Sphingomyelins und der Phosphatidsäuren bzw. Polyglycerophosphate erkennen. Wieder ist die Erhöhung der Synthese der Fraktion A und des Sphingomyelins bei gleichzeitiger Verminderung der Aktivität der im Chromatogramm obersten Bande unter I A G-Inkubation deutlich. - Der Phosphateinbau in alle Phospholipide ist unter Monojodacetat stark gehemmt. Dies ist besonders bei der Hemmung der sonst verstärkten Synthese der I A G-Inkubation zu sehen. Die Inkubation der Erythrozyten ohne Glucose bei pH 6,5 unter Zusatz von MJA zeigt keine wesentliche Änderung des Phosphateinbaus gegenüber dem Versuch mit Glucose/MJA bei pH 7,3.

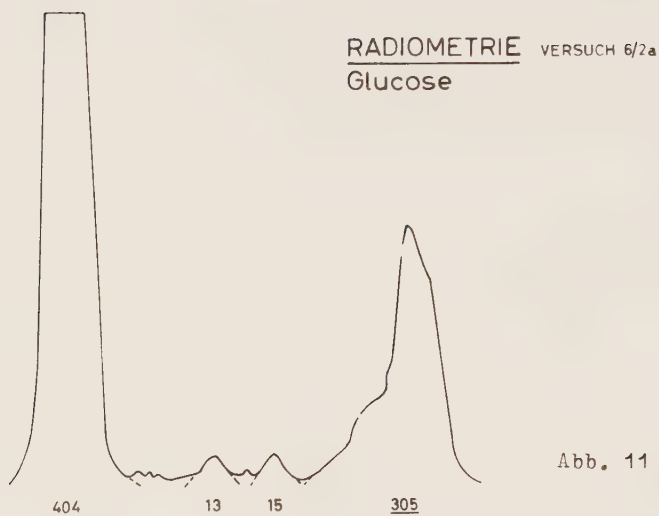


Abb. 11

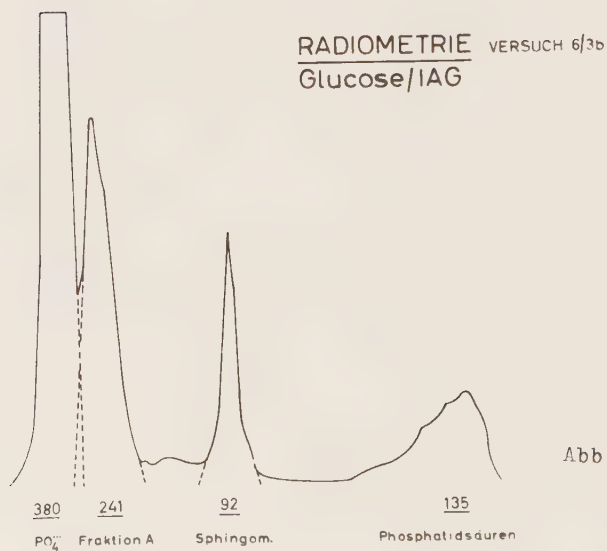
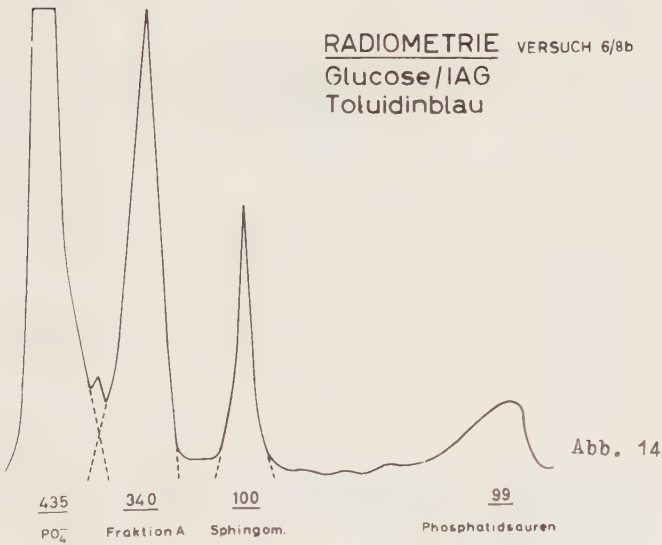
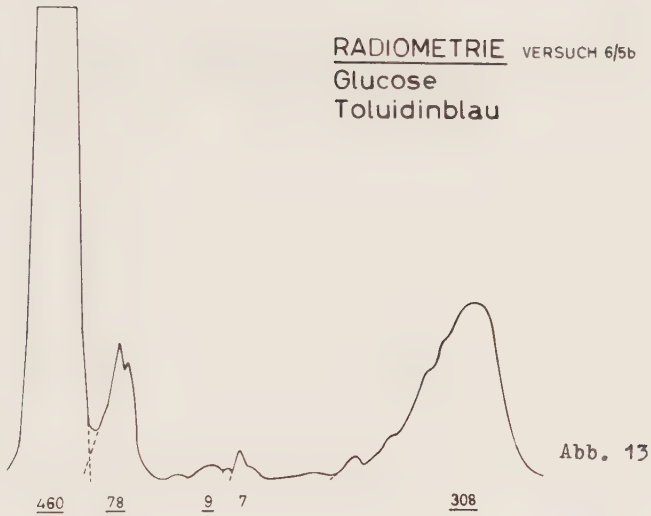
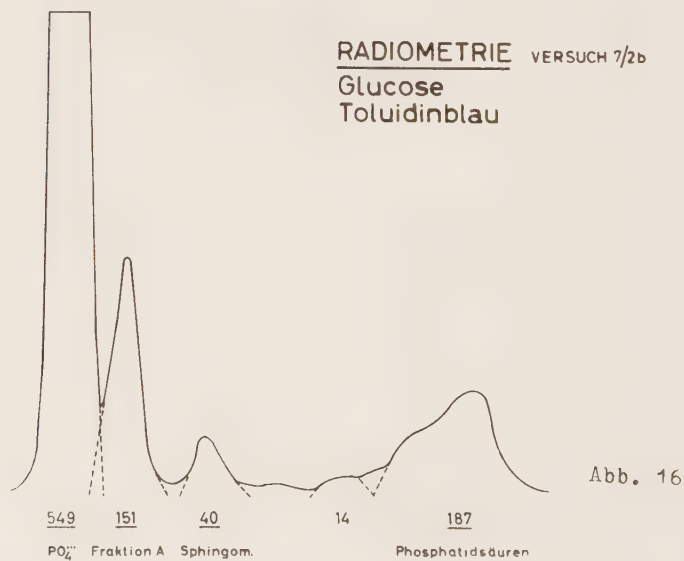
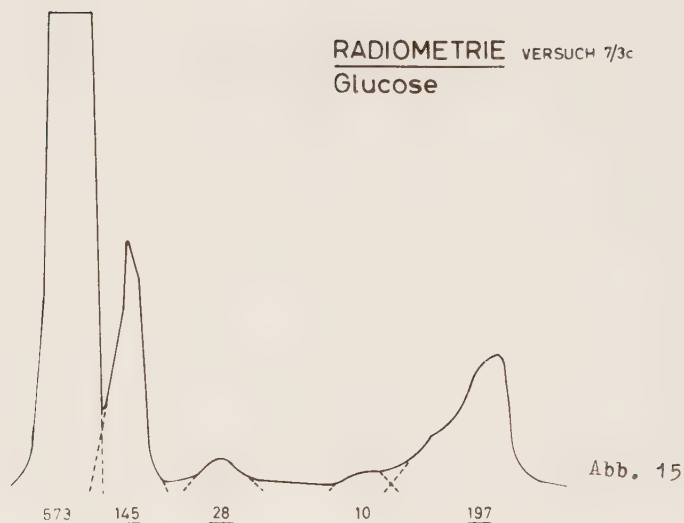


Abb. 12





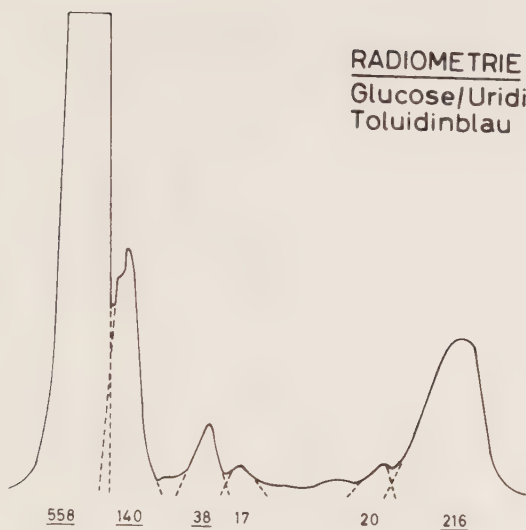


Abb. 17

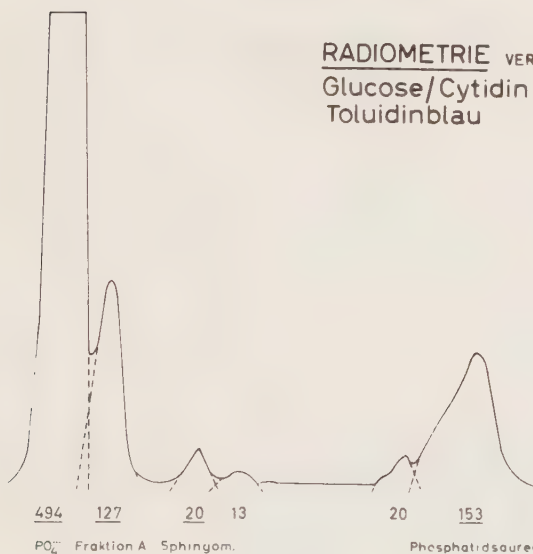
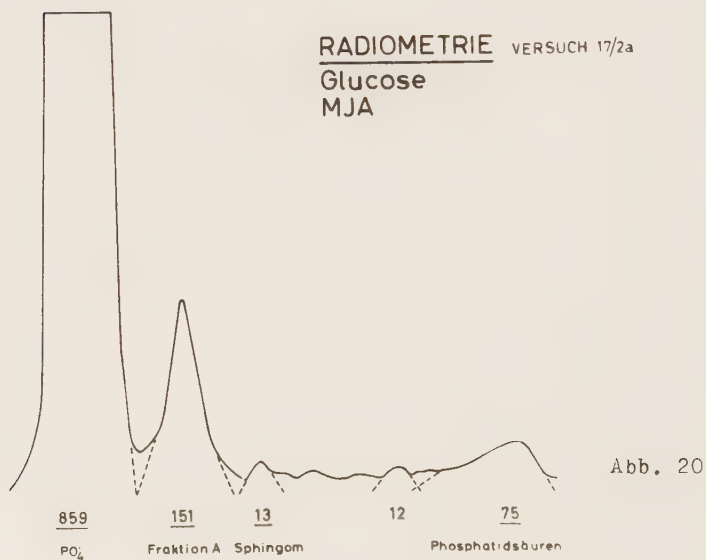
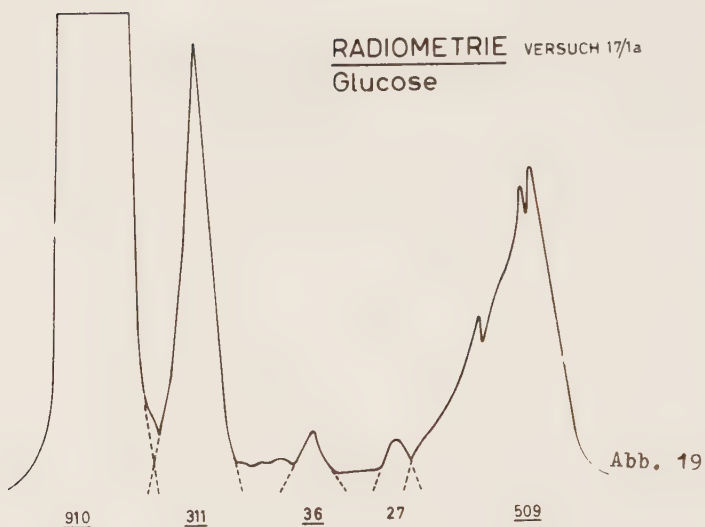
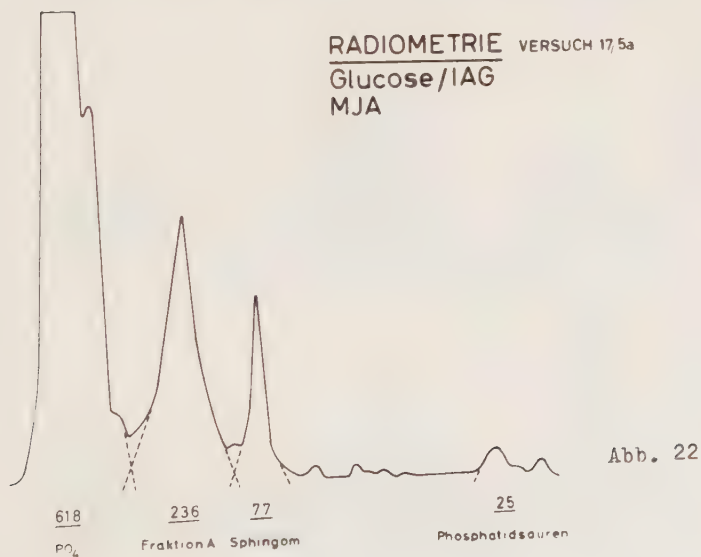
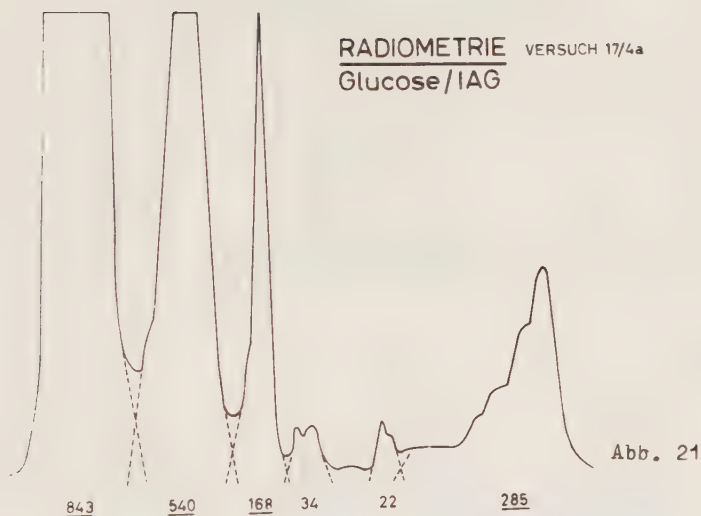


Abb. 18

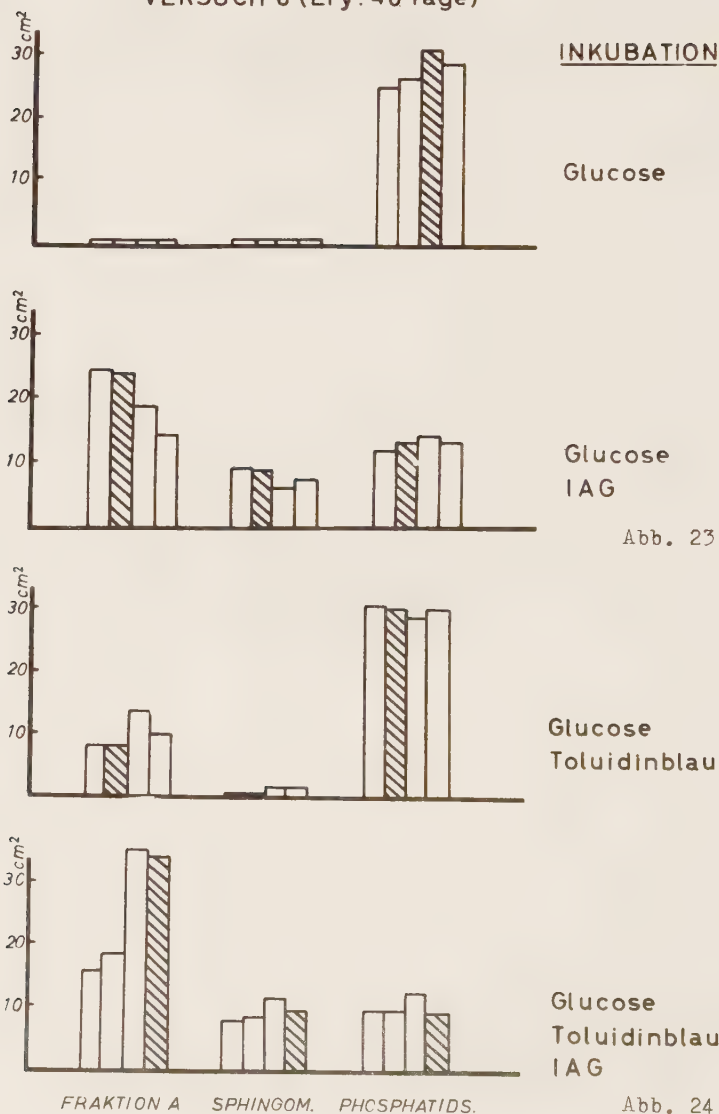
PO₄³⁻ Fraktion A Sphingom.

Phosphatidsäuren





PLANIMETRIE-WERTE
VERSUCH 6 (Ery: 40 Tage)



PLANIMETRIE - WERTE
VERSUCH 7 (Ery:41 Tage)

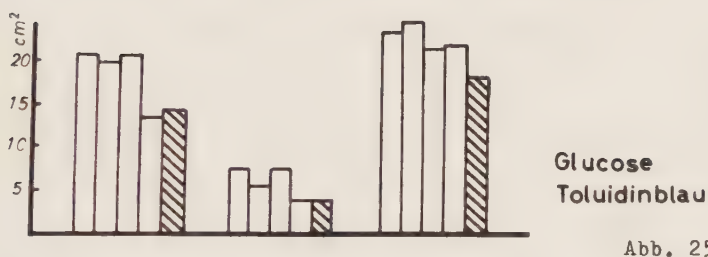
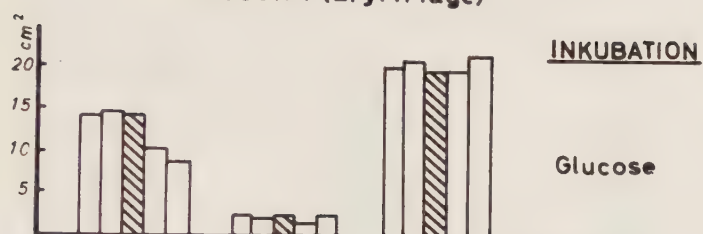


Abb. 25

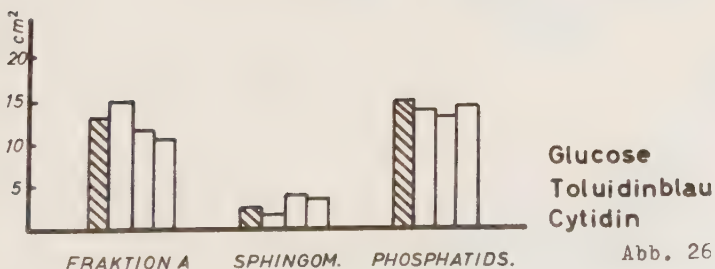


Abb. 26

PLANIMETRIE - WERTE
VERSUCH 17 (Ery: 37 Tage)

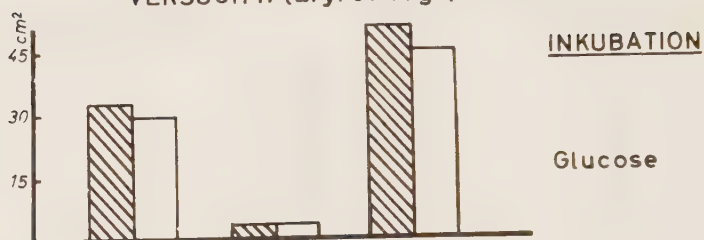


Abb. 27



FRAKTION A SPHINGOM. PHOSPHATIDS.

Abb. 28

DISKUSSION

1. Wirkungsmechanismus von Toluidinblau und Monojodacetat

Der Redoxfarbstoff Toluidinblau beschleunigt als Wasserstoff-Überträger vom $\text{TPNH} + \text{H}^+$ auf Sauerstoff bei der Oxydation von Glucose-6-Phosphat zum Gluconsäure-6-Phosphat den Abbau der Glucose über den Pentosephosphat-Zyklus (38/39).

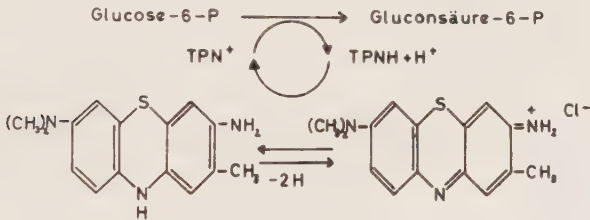


Abb. 29

Der Fermentinhibitor Monojodacetat (MJA) hemmt das Enzym Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (11) und damit die Reaktion

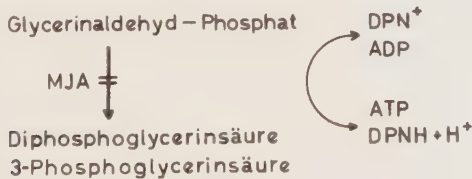


Abb. 30

Durch Monojodacetat wird die ATP-Bildung im Erythrozyten unterbrochen; außerdem kann kein reduziertes Diphosphopyridinnucleotid mehr gebildet werden. - Beide Stoffe sind für die Lipid-Synthese nötig.

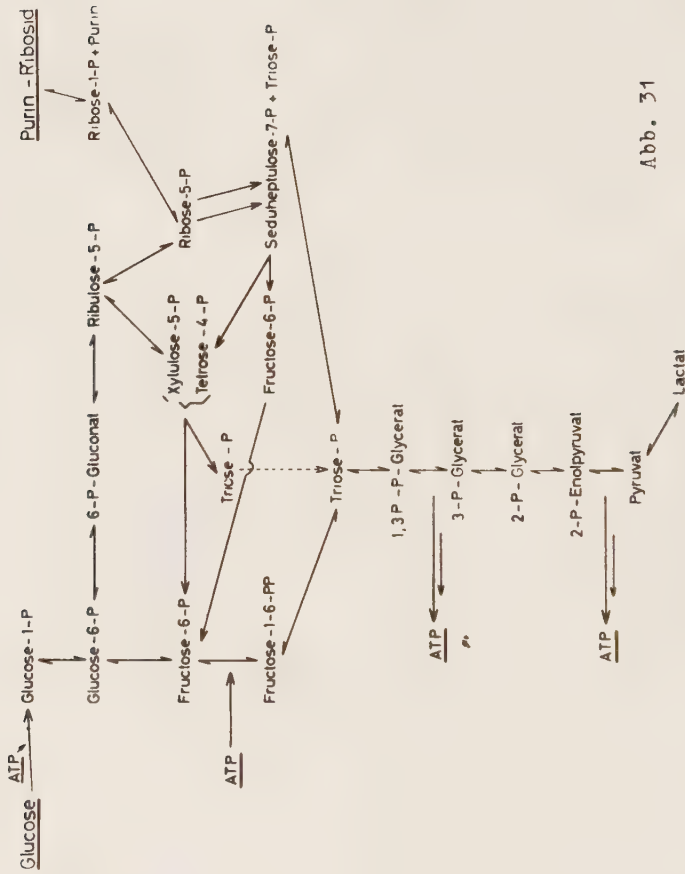


Abb. 31

Kohlhydrat-Stoffwechsel des Erythrozyten und Eintritt
der Nucleoside in den Pentosephosphat-Zyklus

2. Besprechung der Ergebnisse

Zur Erhaltung von Struktur und Stoffwechsel gewinnt der reife Erythrozyt energiereiches Phosphat (ATP) durch den glykolytischen Abbau der Glucose. Das Ferment Hexokinase ist für den Eintritt der Glucose in den Embden-Meyerhof-Abbauweg verantwortlich. Voraussetzung für das Wirken der Hexokinase ist ein hoher ATP-Spiegel; weiterhin ist das Ferment an ein enges pH-Optimum gebunden.

In Blutkonserven tritt mit zunehmender Alterung eine Erhöhung der Wasserstoffionen-Konzentration ein. Dadurch wird die Hexokinase blockiert und durch die vermindert ablaufende Glykolyse der ATP-Spiegel gesenkt. Sinkt aber der ATP-Spiegel, so kann wiederum keine Glucose phosphoryliert werden, so daß sich ein "Circulus vitiosus" einstellt.

Bei der Reifung hat der Erythrozyt wesentliche Stoffwechselsysteme verloren (siehe Abb. 1); mit zunehmender Alterung und besonders bei der Konservierung kommt die Minderung wesentlicher Stoffwechselleistungen hinzu. Rapoport (10) sieht diese besonders in der Reduktion des dreiwertigen Methämoglobins, der Aufrechterhaltung des Na/K-Gradienten und der Erneuerung der Phospholipide der Erythrozytenmembran. - Neben dem Abfall des ATP-Spiegels tritt im alternden Erythrozyten aber auch eine Verminderung des reduzierten Di- und Triphosphopyridin-Nucleotids ($\text{DPNH} + \text{H}^+$ und $\text{TPNH} + \text{H}^+$) auf. Diese Verbindungen

sind in einer noch nicht völlig geklärten Weise als Reduktionspotential für spezielle Reduktasen des Erythrozyten notwendig (Glutathionreduktase/Methämoglobinreduktase). Besonders hingewiesen sei auf die Beteiligung der genannten Co-Fermente bei der Synthese von Lipiden. Ist beim gealterten Erythrozyten der Abbau der Glucose erschwert, so wirkt das Purin-Nucleotid-Gemisch I A G durch die Umgehung der Hexokinase-Reaktion. In der Einleitung wurde schon hervorgehoben, daß ein im Erythrozyten vorhandenes Enzym Nucleosid-Phosphorylase aus Purinnucleosiden Pentose-Phosphat liefert, welches direkt in den oxydativen Abbauweg der Glucose einmündet. Die Abbildung 31 gibt die Zusammenhänge zwischen Glykolyse und Pentosephosphat-Zyklus wieder und zeigt die Eintrittsstelle des Ribosephosphats in den Warburg-Dickens-Horecker-Shunt. Die Abbildung soll zugleich klarmachen, daß via Nucleosid dem Erythrozyten zugeführtes Pentosephosphat entweder in die Glykolyse-Kette einmünden kann oder auch nach Aufbau von Hexosephosphat aus Triosemolekülen in den oxydativen Glucose-Abbau eintreten kann. Die ATP-erfordernde Hexokinasereaktion wird hierbei umgangen und der soeben skizzierte "Circulus vitiosus" unterbrochen.

So wird klar, daß mit I A G inkubierte, gelagerte Erythrozyten einen erhöhten Spiegel an ATP und reduzierter Phosphopyridin-Nucleotide besitzen. Die Beeinflussung des Na/K-Gradienten und die Erhöhung der Methämoglobin-

Reduktion durch I A G im gealterten Erythrozyten sind durch Fritzsche und Wasmann (26/11) bewiesen.

Die hier mitgeteilten Ergebnisse zeigen nun auch eine gestörte Wirkung des Purin-Nucleosid-Gemisches I A G auf den Phospholipid-Stoffwechsel gealterter Erythrozyten. Zwei Fraktionen, Sphingomyelin und die in ihrer Natur noch unbekannte Fraktion A, werden vermehrt gebildet.

Den Nachweis der Lipidsynthese in Erythrozyten hat Altman (34) mit ^{14}C -markiertem Acetat geführt. Reed (49) hingegen spricht dem reifen Erythrozyten die Fähigkeit zur Phospholipid-Synthese ab, weist aber auf einen regen Austausch der Lipide des Erythrozyten mit den Phospholipiden des Serums hin. - Ein Austausch mit Lipiden des umgebenden Mediums ist bei den hier mitgeteilten Versuchen nicht anzunehmen, da die Erythrozyten nach dem Zentrifugieren von Serum befreit und in einer lipidfreien, isotonischen Elektrolytlösung inkubiert wurden.

Es ist bekannt, daß Leukozyten Phospholipide synthetisieren. Der Einwand, die für den Erythrozyten nachgewiesene Phospholipid-Synthese sei durch neugebildete Lipide der Leukozyten vergetuscht, trifft nicht zu. Leukozyten haben ein geringeres spezifisches Gewicht als rote Blutzellen und konnten so als dünne Schicht vom zentrifugierten Sediment abgetrennt werden. Außerdem besitzen die Leukozyten eine kurze Lebensdauer (mehrere Stunden bis max. 24 Tage), so daß bei Versuchen mit 48 Tage alten

Erythrozyten keine lebenden weißen Blutkörperchen mehr vorhanden sind.

Aber auch von rein physikalischen Vorgängen droht die Gefahr der Verfälschung der Ergebnisse. Bader (46) hat kürzlich auf ein interessantes Phänomen hingewiesen: Aus Gewebe extrahierte Phospholipide nehmen bei der Inkubation radioaktive Phosphationen auf. Es handelt sich hier um eine unspezifische, stoffwechsel-unabhängige Adsorption an die Phospholipide. Diese erscheinen dann bei der Chromatographie markiert. In eigenen Versuchen konnte diese Feststellung bestätigt werden. Bei der Inkubation stoffwechselaktiver Erythrozyten zeigen aber gleiche Lipidmengen bei unterschiedlicher Substratzufuhr verschieden starke Aktivitäten. So waren regelmäßig die Aktivitäten bei Inkubation mit dem Purin-Nucleosid-Gemisch I A G höher als bei Glucose. Diese Ergebnisse lassen sich nicht durch das physikalische Phänomen der Absorption erklären, sondern weisen auf Stoffwechselvorgänge hin.

Besonders aber konnte durch den Fermenthemmer Monojodacetat die Markierung der Phospholipide als aktive Stoffwechselleistung herausgestellt werden. Monojodacetat hemmt die glykolytische ATP-Bildung und führt gleichzeitig zu einer starken Verminderung der Phospholipid-Aktivität. Bei einer rein physikalischen Beladung der Phospholipide mit radioaktiven $^{32}\text{PO}_4$ -Ionen dürfte der Fermenthemmer keine Wirkung zeigen. Dennoch muß darauf

hingewiesen werden, daß auch bei MJA-Inkubation noch eine geringfügige Aktivität in den Lipiden gefunden wird. Somit ist eine schwache, unspezifische Markierung bei den Versuchen nicht ausgeschlossen.

Wie aus den einleitenden Betrachtungen hervorgeht, ist die Wirkung des I A G-Gemisches auf die Synthese der Phospholipide durch Beeinflussung des Kohlehydratstoffwechsels zu verstehen. Dies zeigt deutlich die Hemmung der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase durch Monojodacetat; als Folge bleibt die für IAG charakteristische Erhöhung der Phospholipid-Synthese aus.

Nur wenige Nucleoside sind in der Lage, den Kohlehydratstoffwechsel des Erythrozyten zu steigern. Voraussetzung ist das Vorhandensein einer spezifischen Phosphorylase. Die Nucleoside Uridin und Cytidin haben keine Wirkung, da die Spaltung in Pyrimidin und Ribosephosphat ausbleibt. Diese Tatsache zeigt ebenfalls die Wirkung der Nucleoside über den Kohlehydratstoffwechsel.

Im folgenden möchte ich noch auf mögliche Beziehungen des Sphingomyelins und der Fraktion A mit den bei der Chromatographie am weitesten wandernden Phosphatidsäuren bzw. Polyglycerophosphaten hinweisen. Letztere konnten auch noch bei alten Erythrozyten mit hoher Aktivität gefunden werden. Dennoch erweist sich deren Synthese ebenfalls von der Glykolyse abhängig. Durch Monojodacetat tritt eine starke Verminderung der Synthese-Rate dieser Verbindung ein. - Fast als Widerspruch erscheint im

Zusammenhang mit dieser Feststellung der Abfall der Aktivität der Polyglycerophosphate bei einer Steigerung des Kohlehydratstoffwechsels durch I A G. Mit der Minderung der Phosphatidsäure-Aktivität geht aber gleichzeitig eine Erhöhung des Sphingomyelins und der Fraktion A einher.

Beobachtungen über Wechselbeziehungen zwischen den Phosphatidsäuren und den übrigen Phospholipiden des Erythrozyten sind nicht bekannt. Es müssen aber in diesem Zusammenhang die Untersuchungen von Marinetti und Mitarbeiter (45/48) hervorgehoben werden. Diese fanden bei Versuchen mit Rattenleber-Homogenaten eine schnelle Markierung der Phosphatidsäuren mit $^{32}\text{PO}_4$ bei gleichzeitig geringer Synthese der Phospholipide. Die Inkorporation von radioaktivem Phosphor im intakten Lebergewebe in vivo zeigte dagegen ein umgekehrtes Verhalten. Hier sind die Phosphatidsäuren schwach markiert, die Phospholipide dagegen stark. Durch Hemmung der oxydativen Phosphorylierung konnte Marinetti eine Abnahme der Markierung der Phosphatidsäuren feststellen. Sowohl die Blockierung der oxydativen Phosphorylierung im Leberhomogenat als auch die Hemmung der Glykolyse durch MJA im Erythrozyten hat einen Abfall der ATP-Bildung zur Folge. In beiden Fällen findet sich eine Verminderung der Aktivität der im Chromatogramm obersten Bande. - Aus ihren Untersuchungen leiten Marinetti und Mitarbeiter die Phosphatidsäuren bzw. Polyglycerophosphate als Vorstufen in der Synthese der Phospholipide ab. Die für den

Erythrozyten festgestellten Wechselbeziehungen lassen die Polyglycerophosphate bzw. Phosphatidsäuren als Vorstufen für die Synthese des Sphingomyelins und der Fraktion A vermuten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß durch das Purin-Nucleosid-Gemisch I A G eine Steigerung der Phospholipid-Synthese in gealterten Erythrozyten stattfindet. Durch den Einbau der Lipide in die gealterte Membran ist die Möglichkeit der Strukturerneuerung gegeben. Diese findet ihren Ausdruck in der erhöhten mechanischen Resistenz und der verlängerten Lebensdauer.

Weiteren Untersuchungen bleibt es vorbehalten, die absolute Vermehrung der Phospholipide in der Erythrozyten-Membran bei der Konservierung der roten Blutkörperchen mit I A G über längere Zeit nachzuweisen.

ZUSAMMENFASSUNG

Unter Verwendung von radioaktivem Phosphor wurde der Einfluß des Purin-Nucleosid-Gemisches I A G auf den Phospholipid-Stoffwechsel des Erythrozyten untersucht. Es konnte eine deutliche Steigerung der Synthese-Rate des Sphingomyelins und einer noch unbekannten Verbindung (als Fraktion A bezeichnet) bei alten Erythrozyten nachgewiesen werden. Bei frischen Erythrozyten ließ sich diese Wirkung des I A G-Gemisches nicht feststellen. Die Bildung der Phospholipide im Erythrozyten erwies sich in den Versuchen vom Kohlehydratstoffwechsel abhängig. Die I A G-Wirkung bei alten Erythrozyten wurde durch die starke Hebung des ATP-Spiegels und die Vermehrung der reduzierten Pyridinnucleotide erklärt. So zog die Hemmung der Glykolyse durch Monojodacetat, einem Fermentinhibitor, eine deutliche Erniedrigung der Phospholipid-Synthese nach sich. Die Nucleotide Uridin und Cytidin hatten keinen Einfluß auf die Phospholipid-Synthese, da eine für die Nucleoside spezifische Phosphorylase im Erythrozyten fehlt und somit kein Pentosephosphat über den Kohlehydratstoffwechsel abgebaut werden kann. Der Redoxfarbstoff Toluidinblau zeigte nur eine geringe Wirkung. - Es wurde die Spezifität der Phospholipid-Synthese für Erythrozyten eingehend diskutiert.

LITERATUR

- 1) WARBURG, O.
Zur Biologie der roten Blutzellen
Zschr. physiol. Chem. 59, 112 (1909)
- 2) McLEOD, J.J.R.
Blood glycolysis: its extent and significance
in carbohydrate metabolism
J. Biol. Chem. 12, 497 (1913)
- 3) LONDON, I.M.
The metabolism of the erythrocyte
The Harvey Lectures / Series 56 / New York 1961
- 4) PRANKERD, T.A.J.
The Metabolism of the human Erythrocyte: A Review
Brit. J. Haemat. 1, 131 (1955)
- 5) FISCHER, H.; FERBER, E.; FRITZSCHE, W.; WOSEGIEN, F.
und W. SPIELMANN
Erythrozytenstoffwechsel und Blutkonservierung
Ber. Dtsch. Ges. Bluttransf./Bibl. haemat. 12, 76 (1961)
- 6) HORECKER, B.L.
The metabolism of pentose and triose phosphates
in W.D. McElroy and B. Glass: Phosphorus metabolism
Vol. I/ S. 117 Baltimore 1951
- 7) DICKENS, F.
Alternative routes of carbohydrate oxidation
Brit. Med. Bull. 9, 105 (1953)
- 8) HOLLMANN, S.
Nicht-glykolytische Stoffwechselwege der Glucose
Stuttgart 1961
- 9) HARROP, G.A.
The oxygen consumption of human erythrocytes
Arch. Int. Med. (Chicago) 23, 745 (1919)

- 10) RAPOPORT, S.
Dimensional, osmotic, and chemical changes of erythrocytes in stored blood. I. Blood-preserves in sodium citrate, neutral and acid-glucose (ACD) mixtures
J. clin. Invest. 26,591 (1947)
- 11) WOSEGIEN, F.
Versuche über den Phosphateinbau in Erythrozyten bei Verwendung verschiedener Substrate und Fermentinhibitoren
Fol. haemat. (Leipzig) 78(4),224 (1962)
- 12) SCHMIDT, H.A.E.; SCHMITT, H.; KEIDERLING, W.; MATTHES, M. und W. FEISER
Die Radiochromierung als Mittel zur Wertigkeitsbestimmung von Blutkonserven
Acta haemat. (Basel) 23,208 (1960)
- 13) FISCHER, H.; ARGENTON, H. und W. FRITZSCHE
Nichtimmunologische hämolytische Serumfaktoren in der menschlichen Pathologie
in: Hämolyse und hämolytische Erkrankungen
7. Freiburger Symposium 1961
- 14) FISCHER, H.
Überlegungen zur verbesserten Blutkonservierung von Erythrozyten
Fol. haemat. (Leipzig) 78(4),356 (1962)
- 15) GABRIO, B.W.; FINCH, C.A. and F.M. HUENNEKENS
Erythrocyte Preservation: A Tonic in Molecular Biochemistry
Blood 11,103 (1956)
- 16) DISCHE, Z.
Synthesis of hexosemono- and diphosphate from adenosine and ribose-5-phosphate in human blood
in: W.D. McElroy and B. Glass: Phosphorus metabolism
Vol. I/ S. 171 Baltimore 1951

- 1/) DISCHE, Z.
Phosphorylierung der in Adenosin enthaltenen
d-Ribose und nachfolgender Zerfall des Esters
unter Triosephosphatbildung im Blut
Naturwiss. 26,252 (1938)
- 18) PRANKERD, T.A.J. and K.I. ALTMAN
A study of the metabolism of phosphorus in
mammalian red cells
Biochem. J. (London) 58,622 (1954)
- 19) PRANKERD, T.A.J. and K.I. ALTMAN
The effect of adenosine on the phosphate exchange
in mammalian red blood cells
Biochim. biophysica acta 15,158 (1954)
- 20) GABRIO, B.W. and C.A. FINCH
Erythrocyte preservation. I. The relation of
storage lesion to "in vivo" erythrocyte senescence
J. clin. Invest. 33,242 (1954)
- 21) GABRIO, B.W.; DONOHUE, D.M. and C.A. FINCH
Erythrocyte preservation. V. Relationship between
chemical changes and viability of stored blood
treated with adenosine
J. clin. Invest. 34,1509 (1955)
- 22) NAKAO, M.; NAKAO, T.; TATIBANA, M.; YOSHIKAWA, H.
and T. ABE
Effect of inosine and adenine on the adenosine
triphosphate regeneration and shape transformation
in long-stored erythrocytes
Biochim. biophysica acta 32,546 (1959)
- 23) NAKAO, M.; NAKAO, T.; ARIMATSU, Y. and H. YOSHIKAWA
A new preservative medium maintaining the level of
ATP and the osmotic resistance of erythrocyte
Proc. Japan. Acad. 36,43 (1960)

- 24a) FERBER, E.; GÖHRING, I. und H. FISCHER
Die Wirkung von Nucleosiden und Steroiden auf die
mechanische Resistenz frischer und gelagerter
Erythrozyten
Verh. Kongr. europ. Ges. Haemat. 8,479 (1961)
- 24b) FERBER, E. und H. FISCHER
Wirkung von Purinnucleosiden und Steroiden auf die
mechanische Resistenz frischer und gealterter
Erythrozyten
Klin. Wschr. 1963 (im Druck)
- 25) WOSEGIEN, F. und H. FISCHER
Nucleoside als Substrate des Pentosephosphat-Zyklus
Ber. Physiol. (Berlin) 215,9 (1960)
- 26) WOSEGIEN, F.; DOSE, K. und H. FISCHER
Untersuchungen zur verbesserten Blutkonservierung I.
Klin. Wschr. 40,589 (1962)
- 27) SCHOENHEIMER, R.
The dynamic state of body constituents
Cambridge (Mass.) 1946
- 28) WILLIAMS, H.H.; ERICKSON, B.N. and I.G. NACY
The chemical structure of red blood cell
Quart. Rev. Biol. (Baltimore) 16,80 (1941)
- 29) PARPART, A.K. and R. BALLENTINE
Molecular Anatomy of Red Cell Membrane
in: Modern Trends of Physiol. a. Biochem. (N.Y.) 1952
- 30) TURNER, J.C.; ANDERSON, H.M. and C.P. GANDAL
Species differences in red blood cell phosphatides
separated by column and paperchromatography
Biochim. biophysica acta 30,130 (1958)
- 31) de GIER, J.; MULDER, I. and L.L.M. van DEENEN
On the specific lipid composition of red cell membrane
Naturwiss. 48,54 (1961)
- 32) KLIBANSKY, CH. and Z. OSIMI
Chromatographic analysis of res blood cell
phospholipids on silic acid impregnated paper
Bull. Res. Counc. of Israel 9E,143 (1961)

- 33) MUIR, H.M.; NEUBERGER, A. and J.C. PERRONE
Further isotopic studies on haemoglobin
formation in rat and rabbit
Biochem. J. (London) 52,87 (1952)
- 34) ALTMAN, K.I.
The in vitro incorporation of α - ^{14}C -acetate into
the stroma of erythrocyte
Arch. Biochem. and Biophys. 42,478 (1953)
- 35) KENNEDY, E.P.
Die Stoffwechselfunktion der Cytidin-Coenzyme
11. Colloquium der Gesellsch. für Physiol. Chemie
am 28./30. April 1960 in Mosbach/Baden. Springer 1960.
- 36) KARLSON, P.
Biochemie / Stuttgart 1962
- 37) UMBREIT, W.; BURRIS, R.H. and J.F. STAUFFER
Manometric techniques / Minneapolis 1957
- 38) HARROP, G.A. and E.S.G. BARRON
Studies on blood cell metabolism. I. The effect of
methylenblue and other dyes upon oxygen consumption
of mammalian and avian erythrocytes
J. Exper. Med. (N.Y.) 48,207 (1928)
- 39) MICHAELIS, L. and K. SALOMON
Respiration of mammalian erythrocytes
J. Gen. Physiol. (Baltimore) 13,683 (1930)
- 40) BEER, G.J. van; de JONGH H. and J. BOLDINGH
in: Essential Fatty Acids. London 1958
- 41) BERENBLUM, L. and E. CHAIN
An improved method for the colorimetric determination
of phosphate
Biochem. J. (London) 32,295 (1938)
- 42) MARINETTI, G.V. and E. STOTZ
Chromatography of phosphatides on silicic acid
impregnated paper
Biochim. biophysica acta 21,168 (1956)

- 43) BEISS, U. und O. ARMBRUSTER
Die quantitative Bestimmung von Phospholipiden
durch Papierchromatographie
Z. Naturforsch. 13b,79 (1958)
- 44) ANDERSON, H.M. and J.C. TURNER
Relation of hemoglobin to the red cell membrane
J. clin. Invest. 39,1 (1960)
- 45) MARINETTI, G.V.;ERBLAND, J.; ALBRECHT, M. and
E. STOTZ
Time study of incorporation in vivo of ^{32}P -ortho-
phosphate into phosphatides of rat tissues
Biochim. biophysica acta 30,543 (1958)
- 46) BADER
Diskussionsbemerkung (Seite 98)
Biochemie des aktiven Transports
12. Colloquium der Gesellsch. für Physiol. Chemie
am 13./15. April 1961 in Mosbach/Baden. Springer 61.
- 47) GABRIO, B.W. and HUENNEKENS, F.M.
Nucleoside metabolism of stored erythrocyte
Fed. Proc. (Washington) 14,217 (1955)
- 48) MARINETTI, G.V.; ERBLAND, J.; ALBRECHT, M. and
E. STOTZ
The in vitro incorporation of ^{32}P -labeled ortho-
phosphate into the phosphatides of isolated liver
mitochondria
Biochim. biophysica acta 26,130 (1957)
- 49) REED, C.F.
Studies of in vivo and in vitro exchange of ery-
throcyte and plasma phospholipids
J. clin. Invest. 26,591 (1947)

Herrn Prof. Dr. H. Fischer danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die freundliche Beratung bei der Erarbeitung des Stoffgebietes. Gleichzeitig danke ich Herrn Dr. med. E. Ferber für entgegenkommende Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

=====

Physik: Prof. M. Czerny

Chemie: Prof. Th. Wieland; Prof. P. Royen

Zoologie: Prof. H. Giersberg

Botanik: Prof. W. Halbsguth

Anatomie: Prof. D. Starck; Prof. R. Ortmann; Prof. H. Frick

Physiologie: Prof. K. Wezler

Physiolog. Chemie: Prof. K. Felix; Prof. L. Róka

Klinische Chemie: Prof. H. Fischer

Pathologie: Prof. W. Rotter; Prof. F. Büchner; Prof. G. Kahlau

Innere Medizin: Prof. F. Hofi; Prof. L. Heilmeyer; Prof. J. Frey

Chirurgie: Prof. R. Geißendörfer; Prof. H. Krauss; Prof. E. Ungeneuer

Frauenheilkunde: Prof. H. Wimböfer; Prof. A.W. Schwenzer

Kinderheilkunde: Prof. B. de Rudder; Prof. K. Weiße

Hygiene/Bakteriologie: Prof. K. Herzberg

Pharmakologie: Prof. P. Holtz; Prof. F. Hahn

Dermatologie: Prof. F. Herrmann

Augenheilkunde: Prof. R. Thiel

HNO-Heilkunde: Prof. R. Mittermaier

Nervenheilkunde: Prof. J. Zutt; Prof. R. Jung; Prof. R. Frowein

Orthopädie: Prof. E. Güntz

Geschichte der Medizin: Prof. W. Artelt

Gerichtsmedizin: Prof. J. Gerchow

Röntgenologie: Prof. B. Rajewsky; Prof. A. Gebauer; Prof. F. Sturnad

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Experimentelle Untersuchungen über die Phospholipide frischer und gealterter Erythrozyten

im Laboratorium der I. Medizinischen Universitätsklinik in Frankfurt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Fischer mit Unterstützung von Herrn Dr. med. E. Ferber ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht.

Frankfurt/Main, den 5. April 1963

Steffen Binder

LEBENS LAUF

Am 17.12.1936 bin ich als Sohn des kaufmännischen Angestellten Helmut Bender und seiner Ehefrau Ida Charlotte, geb. Kuppinger, in Hannover geboren.

Nach der Volksschule besuchte ich das Hoffmanns Realgymnasium in St. Goarshausen/Rhein und ab 1949 das Leibniz Realgymnasium in Frankfurt-Höchst. An dieser Schule legte ich 1957 das Abitur ab.

Im Frühjahr des gleichen Jahres wurde ich an der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main immatrikuliert. Im Sommer 1963 möchte ich mich zum Medizinischen Staatsexamen melden.

Frankfurt/Main, den 5. April 1963

Heffen Bender

